

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462850

研究課題名(和文) 歯周病原細菌による口腔癌の臓器転移に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The basic study of oral squamous cell carcinoma metastasis related with periodontal pathogen

研究代表者

稲葉 裕明 (Inaba, Hiroaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70359850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Porphyromonas gingivalis に感染した口腔癌細胞株は、プロテアーゼ受容体2 (PAR2) と4が活性化された。PAR2の活性化はNFκBを、PAR4の活性化はp38/HSP27とERK1/2-Ets1経路をそれぞれ活性化し、前駆体マトリックスメタロプロテアーゼ9 (MMP9) の産生を亢進した。細胞外に分泌された前駆体MMP9は、P. gingivalisタンパク分解酵素により活性化され、口腔癌細胞の浸潤能を促進した。またP. gingivalis感染口腔扁平上皮癌細胞株の浸潤能促進は、アップル・ホップポリフェノールにより抑制された。

研究成果の概要(英文)：Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) is implicated in the invasion and metastasis of tumor cells. We examined the involvement of Porphyromonas gingivalis, a periodontal pathogen, in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines invasion through induced proMMP9 production and its activation. P. gingivalis also stimulated proteinase-activated receptor 2 (PAR2) and 4, and enhanced proMMP9 expression, which promoted cellular invasion. Infected OSCC cells exhibited activation of ERK1/2, p38, and NF-κB, and their inhibitors diminished both proMMP9 production and cellular invasion. Together, our results show that P. gingivalis activated the PAR2/NF-κB, PAR4-ERK1/2-Ets1 and PAR4/p38/HSP27 pathways to induce proMMP9 expression, after which the proenzyme was activated by proteases to promote cellular invasion of OSCC cell lines. In addition, our data show that apple- and hop-polyphenols were potent inhibitors of proMMP9 activation and cellular invasion mediated with P. gingivalis.

研究分野：医歯薬学 歯学 形態系基礎歯科学 口腔細菌学

キーワード：P. gingivalis タンパク分解酵素 歯周病 口腔癌 浸潤・転移 シグナル伝達 マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病罹患は口腔癌のリスクファクターであり、歯周病原菌が原因の1つと考えられている。歯周病患者は、口腔癌の罹患率は肺がん罹患率の1.4倍と高い値を示し、口腔癌および食道癌は、歯周病罹患により発病リスクの増大が示唆されている。また、頭頸部癌の死亡率は、歯周病患者ではリスク比3.38、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染者ではリスク比2.25と高い値を示している。実際、ヒト口腔癌検体より *P. gingivalis* が検出され、*P. gingivalis* 抗原は口腔および上部消化器癌の特異的なバイオマーカーである可能性が示唆されている。癌の浸潤に關与するマトリックスメタロプロテアーゼ9 (MMP9) は、*P. gingivalis* の感染により単球や歯肉上皮からの分泌が誘導される。また、*P. gingivalis* が検出される歯周ポケットの歯肉溝浸出液からは顕著に MMP9 タンパクが検出される。これらのことは、*P. gingivalis* が癌細胞の増殖や浸潤を促進する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、*P. gingivalis* に感染させた口腔扁平上皮癌細胞株の浸潤ならびに転移の分子機構を解明し、歯周病と口腔癌浸潤との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞株と細菌株

実験には、JCRB 細胞バンクから供与されたヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 SAS (JCRB0260) と Ca9-22 (JCRB0625) を使用した。菌株は *Porphyromonas gingivalis* ATCC3327、KDP129 (*kgp* 欠損株)、KDP133 (*rgpA rgpB* 欠損株)、KDP136 (*rgpA rgpB kgp* 欠損株) および *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 を使用した。

(2) 口腔癌浸潤機能の解析

MMP9 の活性は、ゼイモグラフィーにて評価した。口腔癌細胞の浸潤能は、マトリゲルインページョンチャンバーを用いて評価した。

(3) 受容体ならびにシグナル伝達の解析

PAR2ならびにPAR4の活性は、real-time PCRで解析した。シグナル伝達は、ERK1/2、JNK、p38、IkBa、NF-kB、cJun、HSP27、Ets1、Ets2のリン酸化または発現をウェスタンブロッティングで解析した。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* による口腔扁平上皮癌細胞株の浸潤能亢進

SAS 細胞から産生分泌される前駆体 MMP9 (図1A) は、*P. gingivalis* 感染により前駆体 MMP9 が活性化された (図1B)。

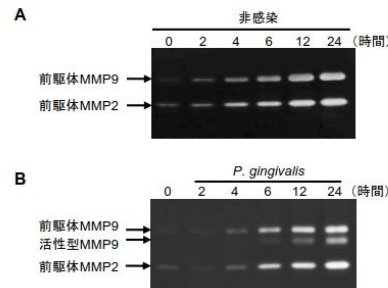


図1 *P. gingivalis*によるSAS細胞の前駆体MMP9分泌亢進と活性化

A: *P. gingivalis*非添加群

B: *P. gingivalis*添加群

高浸潤型SAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、2、4、6、12、24時間培養した。培養上清のMMP9活性をゼラチンゼイモグラフィーにて評価した。

また *P. gingivalis* 感染により SAS 細胞の浸潤能は有意に亢進され、これは MMP9 阻害剤により顕著に抑制された (図2)。

大腸癌のリンパ節転移との関連性が示唆さ

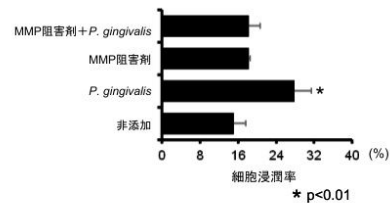


図2 MMP9特異的阻害剤による*P. gingivalis*感染SAS細胞の浸潤能への影響

MMP9特異的阻害剤を添加した培地での*P. gingivalis*感染SAS細胞の浸潤能をマトリゲルインページョンチャンバーを用いて評価した。

れている歯周病原性菌 *F. nucleatum* の感染では、前駆体9は活性化されず、浸潤能の亢進も見られなかった (図3)。

低浸潤能である Ca9-22 細胞は前駆体 MMP9

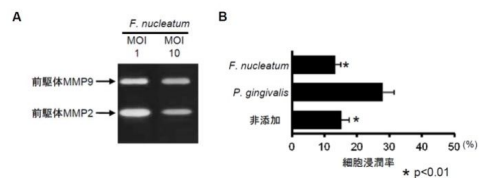


図3 *F. nucleatum*によるSAS細胞の前駆体MMP9分泌亢進と活性化ならびに浸潤能への影響

A: SAS細胞に*F. nucleatum*を感染させ、24時間後に細胞培養上清のMMP9活性をゼラチンゼイモグラフィーにて評価した。

B: *P. gingivalis*または*F. nucleatum*を感染させ、24時間感染させたSAS細胞の浸潤能をマトリゲルインページョンチャンバーを用いて評価した。

の産生が認められず、*P. gingivalis* 感染によっても前駆体 MMP9 産生と細胞浸潤に影響は見られなかった (図4A)。一方、*P. gingivalis* により活性化された MMP9 を添加したところ、有意な浸潤能の亢進が認められた (図4B)。

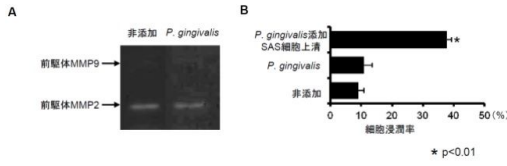


図4 *P. gingivalis*によるCa9-22細胞の前駆体MMP9分泌充進と活性化ならびに浸潤能への影響
A: Ca9-22細胞に*P. gingivalis*を感染させ、24時間細胞培養した。培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィーにてMMP9の活性を評価した。
B: Ca9-22細胞を、*P. gingivalis*感染SAS細胞培養上清で培養し、マトリゲルインページョンチャンバーを用いて浸潤能を評価した。

(2) *P. gingivalis* 感染後の PAR2 と PAR4 活性化に関連するシグナル伝達機構の解析
P. gingivalis 感染口腔癌細胞の PAR 群発現とを検証した。その結果、*P. gingivalis* 感染後、PAR2 と PAR4 mRNA が増加した (図5)。

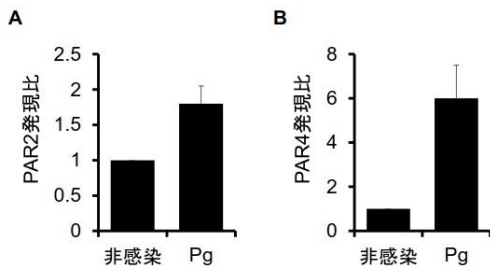


図5 *P. gingivalis*によるSAS細胞のPAR2とPAR4の発現変化
SAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、24時間後にRNAを抽出し、cDNAを作成し、Real-time PCRによりPAR2とPAR4の発現を評価した。

そこで、PAR2 発現と前駆体 MMP9 産生の関連を調べるために、PAR2 ノックダウン SAS 細胞を用いた。PAR2 ノックダウン SAS 細胞

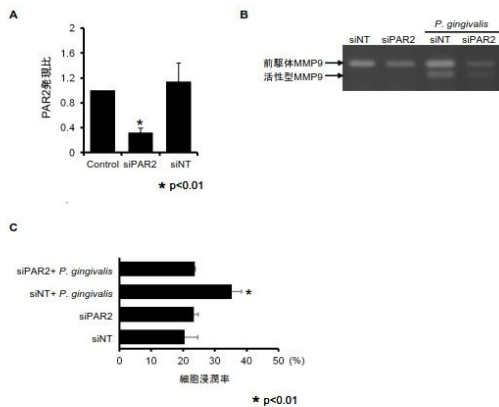


図6 PAR2ノックダウンSAS細胞の前駆体MMP9分泌と浸潤能への影響
A: siPAR2によるPAR2発現への効果をReal-time PCRにより確認した。siNT=陰性対照
B: PAR2ノックダウンSAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、24時間後に培養上清中のMMP9活性をゼラチンゼイモグラフィーにて評価した。
C: PAR2ノックダウンSAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、細胞浸潤能をマトリゲルインページョンチャンバーを用いて評価した。

における遺伝子発現抑制効果を、リアルタイムPCRを用い確認した(図6A)。PAR2 ノックダウン細胞に *P. gingivalis* を感染させたところ、感染 24 時間後において前駆体 MMP9 の発現が有意に抑制され、細胞浸潤も顕著に抑制された(図6BとC)。PAR4 ノックダウン SAS 細胞でも同様の結果を得た(図7)。

そこで、PAR2 ならびに PAR4 発現とシグナ

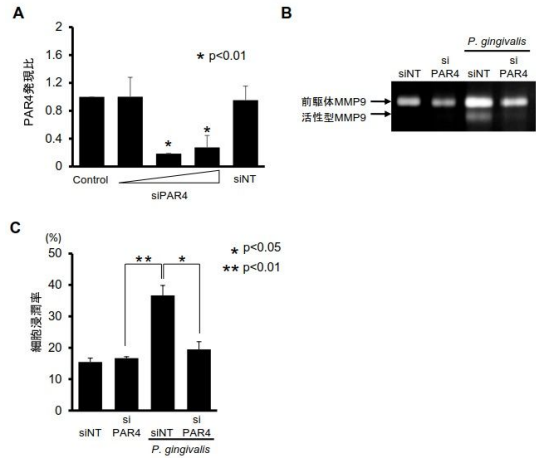


図7 PAR4ノックダウンSAS細胞の前駆体MMP9分泌と浸潤能への影響
A: siPAR4によるPAR2発現への効果をReal-time PCRにより確認した。siNT=陰性対照
B: PAR4ノックダウンSAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、24時間後に培養上清中のMMP9活性をゼラチンゼイモグラフィーにて評価した。
C: PAR4ノックダウンSAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、細胞浸潤能をマトリゲルインページョンチャンバーを用いて評価した。

ル伝達経路との関連性を検証した。*P. gingivalis* 感染により SAS 細胞の ERK1/2、p38、I κ B α のリン酸化ならびに NF- κ B の核移行が認められた。さらに、p38 の下流に存在する HSP27 のリン酸化、ERK1/2 の下流に存在する転写因子 Ets1 の発現充進も認められた(図12にまとめを記載)。また HSP27 ならびに Ets1 ノックダウン細胞では、*P. gingivalis* 感染による前駆体 MMP9 の発現誘導は抑制された(図8)。

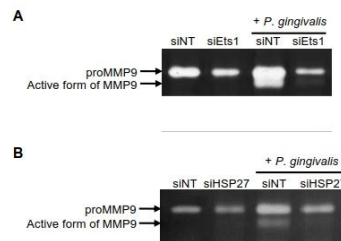


図8 Ets1ならびにHSP27ノックダウンSAS細胞の前駆体MMP9分泌と浸潤能への影響
A: Ets1ノックダウンSAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、24時間培養した。細胞培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィーにてMMP9の活性化を評価した。
B: HSP27ノックダウンSAS細胞に*P. gingivalis*を感染させ、24時間培養した。細胞培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィーにてMMP9の活性化を評価した。

(3) MAPK 活性化と前駆体 MMP9 産生シグナルの活性化と前駆体 MMP9 産生誘導への関連性を検討するため、p38、ERK1/2 ならびに NF- κ B 阻害剤を用いた。PDTC (NF- κ B 阻害剤) PD98059 (ERK1/2 阻害剤) および SB202190 (p38 阻害剤) は、*P. gingivalis* による前駆体 MMP9 産生と培養上清中での活性化を抑制した(図9)。各阻害剤を組み合わせた場合においても、抑制効果を示した。これに対し、SP600125 (JNK 阻害剤) は抑制効果

を示さなかった。これらの結果から、*P. gingivalis* 感染により誘導される前駆体 MMP9 産生は、p38、ERK1/2 および NF-κB を含む複数のシグナル伝達経路を介することが示唆された。

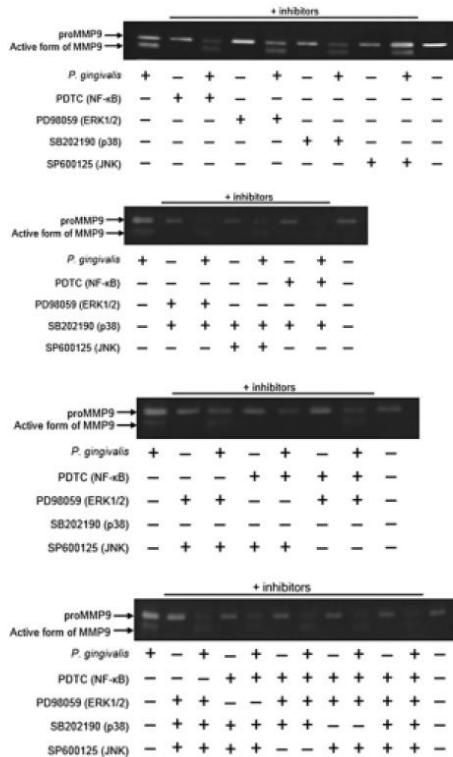


図9 ERK1/2, p38, JNKならびにNF-κB阻害剤の前駆体MMP9産生への影響
PDTC (NF-κB阻害剤)、SB203580 (p38阻害剤)、SP600125 (JNK阻害剤)、PD98059 (ERK1/2阻害剤)をそれぞれ添加した培地で24時間培養を行い、ゼラチンゼイモグラフィによりMMP9の活性化を評価した。

(4) *P. gingivalis* タンパク分解酵素と口腔癌浸潤能との関連性

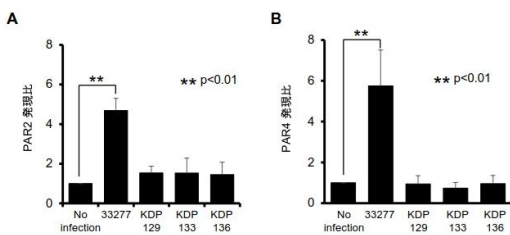


図10 *P. gingivalis* タンパク分解酵素ノックアウト株感染によるSAS細胞のPAR2とPAR4の発現変化
SAS細胞に*P. gingivalis* タンパク分解酵素ノックアウト株を感染させ、24時間後にRNAを抽出し、cDNAを作成し、Real-time PCRによりPAR2とPAR4の発現を評価した。

タンパク分解酵素欠損変異株の感染では、PAR2、PAR4の発現亢進は認められなかった(図10)。次に前駆体MMP9の活性化とタンパク分解酵素の関連性を検証した。*kgp* 欠損株(KDP129)、*rgpA rgpB* 欠損株(KDP133)による感染では前駆体MMP9の産生誘導が認められたが、*rgpA rgpB kgp* 欠損株(KDP136)による誘導は見られなかった(図11A)。一方、いずれの欠損株においても前駆体MMP9の活性化は認められず、浸潤能の亢

進も見られなかった(図11B)。前駆体MMP9の産生は、RgpとKgpのどちら

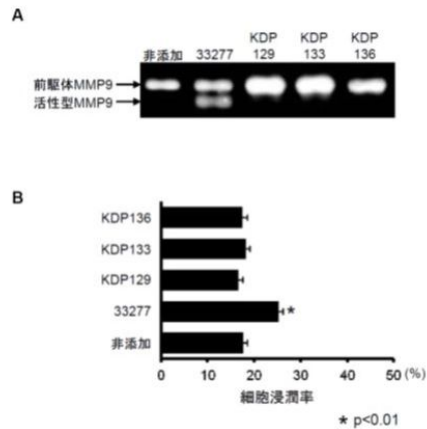


図11 口腔癌浸潤における*P. gingivalis*タンパク分解酵素の影響を解析

A: *P. gingivalis*タンパク分解酵素ノックアウト株に24時間感染させた後、培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィによりMMP9の活性を評価した。

B: *P. gingivalis*タンパク分解酵素ノックアウト株を感染させ、細胞浸潤能をマトリゲルインバージョンチャンバーを用いて評価した。

らか一方により誘導されるが、その活性化にはRgpとKgpの両方が必要であることが示された。これらの結果から、*P. gingivalis*が有するジンジバインが、前駆体MMP9の活性化を促進し、結果的に浸潤能の亢進に与与していることが示唆された。

(5) 前駆体MMP9産生に関わるシグナル伝達と活性化のまとめ

本研究では、*P. gingivalis*の口腔癌細胞の浸潤能亢進に与与する分子基盤に解析を加えた。その結果、*P. gingivalis*はp38/HSP27、ERK1/2-Ets1ならびにPAR2/NF-κBを含む複数のシグナル伝達経路を介して前駆体MMP9の産生を誘導すること。さらに前駆体

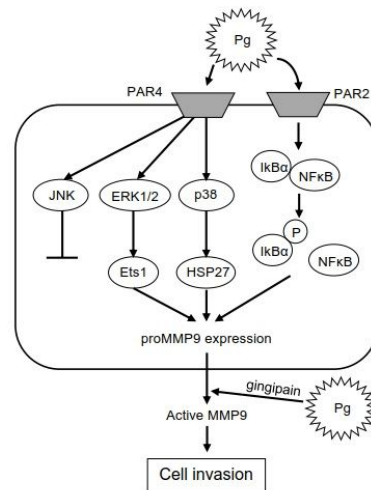


図12 シグナル伝達解析まとめ

*P. gingivalis*によりERK1/2-Ets1, p38/HSP27ならびにPAR2/NF-κB経路が活性化され、前駆体MMP9が産生される。細胞外へ分泌された前駆体MMP9は、*P. gingivalis*ジンジバインによって活性化され、口腔癌細胞の浸潤能を亢進する。

MMP9 が *P. gingivalis* タンパク分解酵素により活性化され、SAS 細胞の浸潤能を亢進することにより、*P. gingivalis* が口腔癌の浸潤を促進する可能性が示された (図 12)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Murakami Y, Amano A, Matsumoto-Nakano M. Apple- and hop-polyphenols inhibit *Porphyromonas gingivalis*-mediated precursor of matrix metalloproteinase 9 activation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Journal of Periodontology*, 2016 87(9): 1103-1111. 査読有
2. Zhou Y, Sztukowska M, Wang Q, Inaba H, Potempa J, Scott DA, Wang H, Lamont RJ. Noncanonical activation of β -catenin by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 2015 83(8):3195- 3203. 査読有
3. Inaba H, Amano A, Lamont RJ, Murakami Y. Involvement of protease-activated receptor 4 in over-expression of matrix metalloproteinase 9 induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Med Microbiol Immunol*. 2015 204(5):605- 612. 査読有
4. Inaba H, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cellular Microbiology*, 2014 16(1): 131-145. 査読有

[学会発表](計 24 件)

1. 高島由紀子、吉田翔、森本節代、吉田衣里、角田陽子、平野慶子、稲葉裕明、仲野道代。本院小児医療センター開設後の当科における患者実態調査。第 35 回日本小児歯科学会中四国地方会大会(岡山市): 2016 年 11 月。
2. 荒井延明、安田隼也、津村はな、稲葉裕明、仲野道代、野村良太、仲野和彦、浅井史敏。犬における歯周病進行と年齢・犬種および *Porphyromonas gulae* 菌保有の関連性。第 37 回動物臨床医学年次大会(大阪市): 2016 年 10 月。
3. 吉田翔、稲葉裕明、野村良太、山崎由衛、

仲野和彦、仲野道代。カイコ感染モデルを用いた *Porphyromonas gulae* の病原性解析。第 37 回岡山歯学会(岡山市): 2016 年 10 月。

4. 稲葉裕明。基礎から見直す歯周疾患の知識。第 35 回日本小児歯科学会近畿地方会大会(吹田市): 2016 年 10 月。
5. 稲葉裕明、天野敦雄、仲野道代。*P. gingivalis* 感染による p38/JNK を介したヒト胎盤栄養膜細胞のアポトーシス誘導。第 58 回歯科基礎医学会(札幌市): 2016 年 8 月。
6. 稲葉裕明。歯周病菌 *P. gingivalis* 感染と全身疾患を結ぶ分子機構の解明。第 10 回 ARCOCS セミナー(岡山市): 2016 年 7 月。
7. Inaba H, Yoshida S, Nomura R, Nakano K, Matsumoto-Nakano M. Effects of clindamycin on silkworm larvae *Bombyx mori* model infected with *Porphyromonas gulae*. 94th General session of the IADR(韓国・ソウル): 2016 年 6 月。
8. Yoshida S, Inaba H, Nomura R, Nakano K, Matsumoto-Nakano M. Protective effects of clindamycin against *Porphyromonas gulae* toxicity in the silkworm larvae. 第 10 回アジア小児歯科学会・第 54 回小児歯科学会(東京都): 2016 年 5 月。
9. 堀江俊、猪俣恵、出水川雅司、長谷川義明、稲葉裕明、引頭毅、北井則行、村上幸孝。*Tannerella forsythia* が有する OmpA 様蛋白質の宿主細胞付着への関与。第 57 回歯科基礎医学会学術大会(新潟市): 2015 年 9 月。
10. 猪俣恵、引頭毅、堀江俊、出水川雅司、稲葉裕明、長谷川義明、北井則行、村上幸孝。*Porphyromonas gingivalis* の有する OmpA 様蛋白質の血管内皮細胞に及ぼす影響。第 29 回日本バイオフィルム学会学術集会(蒲郡市): 2015 年 7 月。
11. 堀江俊、猪俣恵、出水川雅司、長谷川義明、稲葉裕明、引頭毅、北井則行、村上幸孝。*Tannerella forsythia* に存在する糖鎖修飾を有する OmpA 様蛋白質の分離とその性質の解析。第 29 回日本バイオフィルム学会学術集会(蒲郡市): 2015 年 7 月。
12. 引頭毅、猪俣恵、稲葉裕明、村上幸孝、柴田 健一郎。マウス唾液腺における抗菌性因子産生におけるシグナル伝達分子 MyD88 の役割の検討。第 88 回日本細菌学会(岐阜市): 2015 年 3 月。

13. 堀江俊、猪俣恵、出水川雅司、稲葉裕明、引頭毅、北井則行、村上幸孝 . *Tannerella forsythia* が有する OmpA 様蛋白質の宿主細胞レクチンとの結合性及び細胞付着への寄与 . 第 88 回日本細菌学会 (岐阜市): 2015 年 3 月 .
14. 猪俣恵、引頭毅、稲葉裕明、堀江俊、北井則行、村上幸孝 . *Porphyromonas gingivalis* の有する OmpA 様蛋白質の血管内皮細胞に及ぼす影響 . 第 88 回日本細菌学会 (岐阜市): 2015 年 3 月 .
15. 村上幸孝、引頭毅、稲葉裕明、猪俣恵 . 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在する小麦胚芽レクチン反応性 OmpA 様蛋白質の修飾糖鎖の性質 . 第 44 回東海乳酸菌研究会研究報告会 (名古屋市): 2015 年 2 月 .
16. 堀江俊、猪俣恵、出水川雅司、稲葉裕明、引頭毅、北井則行、村上幸孝 . *Tannerella forsythia* が有する OmpA 様蛋白質の宿主細胞表面レクチンへの結合能の解析 . 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (福岡市): 2014 年 9 月 .
17. 猪俣恵、引頭毅、稲葉裕明、堀江俊、北井則行、村上幸孝 . *Porphyromonas gingivalis* は OmpA 様蛋白質を介して血管内皮細胞に付着し細胞応答や細胞死を誘導する . 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (福岡市): 2014 年 9 月 .
18. 出水川雅司、井貝亮太、堀江俊、長谷川義明、猪俣恵、稲葉裕明、引頭毅、吉村文信、北井則行、村上幸孝 . 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における蛋白質リン酸化の増殖への影響 . 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡市): 2014 年 9 月 .
19. 引頭毅、猪俣恵、稲葉裕明、村上幸孝 . 唾液腺における抗体ならびに抗菌性タンパク質産生におけるシグナル伝達分子 MyD88 の役割の検討 . 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡市): 2014 年 9 月 .
20. 高橋らら、高本将司、落合宏樹、猪俣恵、稲葉裕明、長谷川義明、引頭毅、村上幸孝 . 原理の異なる唾液検査キットのミュータンズレンサ球菌検出能の比較 . 岐阜歯科学会第 179 回例会 (瑞穂市): 2014 年 6 月 .
21. 稲葉裕明 . *P. gingivalis* 感染と全身疾患を結ぶ分子基盤の探索 . 第 87 回日本細菌学会総会 (東京都): 2014 年 3 月 .
22. Inaba H., Amano A. *Porphyromonas*

gingivalis promotes invasion of oral cancer through MMP9 activation. 10th IADR World Congress on Preventive Dentistry(ハンガリー・ブタペスト): 2013 年 10 月 .

23. 久保庭雅恵、Alghamdi Samar、稲葉裕明、橋野恵衣、天野敦雄 . 歯肉上皮細胞由来ポリアミンが *Porphyromonas gingivalis* の病原性に及ぼす影響 . 第 62 回口腔衛生学会 (松本市) 2013 年 5 月 .
24. 稲葉裕明、久保庭雅恵、天野敦雄 . *Porphyromonas gingivalis* 感染がヒト口腔癌細胞の浸潤能に及ぼす影響 . 第 62 回口腔衛生学会 (松本市) 2013 年 5 月 .

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

無し

○取得状況 (計 0 件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

稲葉 裕明 (Hiroaki Inaba)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 70359850

(2)研究分担者

野田 健司(Kenji Noda)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号 : 00290908

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

Richard J Lamont